

ESTROGEN RECEPTOR GENE AND ITS USE

Publication number: JP2001197890

Publication date: 2001-07-24

Inventor: SAITO KOICHI

Applicant: SUMITOMO CHEMICAL CO

Classification:

- international: **C12N15/09; C07K14/72; C12N1/19; C12N5/10;
C12P21/02; C12Q1/02; C12R1/645; C12R1/91;
C12N15/09; C07K14/435; C12N1/19; C12N5/10;
C12P21/02; C12Q1/02; C12P21/02; (IPC1-7):
C12N15/09; C07K14/72; C12N1/19; C12N5/10;
C12P21/02; C12Q1/02; C12N1/19; C12R1/645;
C12N5/10; C12R1/91; C12P21/02; C12R1/91;
C12P21/02; C12R1/645; C12Q1/02; C12R1/91**

- European:

Application number: JP20000340097 20001108

Priority number(s): JP20000340097 20001108; JP19990318113 19991109

Report a data error here

Abstract of JP2001197890

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new estrogen receptor gene that can be used for an assay system for evaluating an estrogen receptor activity-regulating ability of a chemical substance.

SOLUTION: This is a gene encoding an estrogen receptor selected from (a) an estrogen receptor having a specific amino acid sequence derived from fish *Lepomis centrarchidae*, (b) an estrogen receptor having an amino acid sequence having a homology to the amino acid sequence of (a) at 95% or more, (c) an estrogen receptor having a specific amino acid sequence that is derived from *L. centrarchidae* and is different from (a), and (d) an estrogen receptor having an amino acid sequence having a homology to the amino acid sequence of (c) at 95% or more.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-197890
(P2001-197890A)

(43) 公開日 平成13年7月24日 (2001.7.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	データベース* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/72	
C 0 7 K 14/72		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02		(C 1 2 N 1/19	
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 34 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2000-340097(P2000-340097)	(71) 出願人	000002093
(22) 出願日	平成12年11月8日 (2000.11.8)		住友化学工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願平11-318113	(72) 発明者	大坂府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
(32) 優先日	平成11年11月9日 (1999.11.9)		斎藤 幸一
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住
		(74) 代理人	友化学工業株式会社内
			100093285
			弁理士 久保山 隆 (外2名)

(54) 【発明の名称】 エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系に利用することのできる新たなエストロゲンレセプター遺伝子の提供。

【解決手段】 以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載のエストロゲンレセプターをコードする遺伝子。

(a) 魚類ブルーギル (*Lepomis centrarchidae*) 由来の特定のアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) (a) のアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) (a) とは異なるブルーギル由来の特定のアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(d) (c) のアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の(a)～(d)のいずれかに記載のエストロゲンレセプターをコードする遺伝子。

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) 配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(d) 配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【請求項2】配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424～1941で表される塩基配列、または配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子。

【請求項3】請求項1または2記載のエストロゲンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項4】エストロゲンレセプター遺伝子にプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項3記載のベクター。

【請求項5】ベクターがウイルスである請求項3または4記載のベクター。

【請求項6】請求項5記載のベクターを含有するウイルス粒子。

【請求項7】宿主細胞内で複製可能なベクターに請求項1または2記載のエストロゲンレセプター遺伝子を組込むことを特徴とするベクターの製造方法。

【請求項8】請求項1または2記載のエストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】請求項3～5のいずれかに記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項10】エストロゲンレセプター遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる請求項8または9記載の形質転換体。

【請求項11】宿主細胞が動物細胞である請求項8～10のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項12】宿主細胞が哺乳類動物細胞である請求項8～11のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項13】宿主細胞が昆虫類動物細胞である請求項8～11のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項14】宿主細胞が酵母細胞である請求項8～10のいずれかに記載の形質転換体。

【請求項15】請求項1もしくは2記載の遺伝子または請求項3～5のいずれかに記載のベクターを宿主細胞に導入することを特徴とする形質転換体の製造方法。

【請求項16】請求項8～14のいずれかに記載の形質転換体を培養してエストロゲンレセプターを産生させることを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法。

【請求項17】配列番号1または配列番号4のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【請求項18】配列番号1または配列番号4のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

【請求項19】請求項1または2記載のエストロゲンレセプター遺伝子を発現し、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子が導入されている形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含む被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法。

【請求項20】リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域と、エストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域とがリガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツウハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための請求項1または2記載のいずれかに記載のエストロゲンレセプター遺伝子の使用。

【請求項21】請求項17または18記載のエストロゲンレセプターと被験物とを接触させ保通する工程を含むレセプターバインディングアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロゲンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロゲン様活性を示すことが報告され、例えばある種の化学物質による野生の魚類等の雌性化の報告がなされている(T. Colborn, D. Dumanoski and J. P. Myers著: Our Stolen Future, 1996, Dutton, New York発行)。かかる化学物質の活性はヒトを含めた各種生物のホルモンバランスを崩し、異常や疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロゲン様活性を測定する試みがなされている。エストロゲンが、エストロゲンの標的細胞に存在するエストロゲンレセプターに結合すると、該レセプターは活性化されて染色体上のエストロゲン応答配列に結合し、そこへさらに、エストロゲンとエストロゲンレセプターとの複合体を認識する転写共役因子群が結合して、該応答配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロゲン様活性を測定するための方法として、化学物質のエストロゲンレセプター活性調

3
 節能を評価するための試験系の開発が求められており、該試験系に利用することのできるエストロゲンレセプター遺伝子が切望されている。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるブルーギルからエストロゲンレセプター遺伝子を単離することに成功し、本発明に至った。すなわち、本発明は、

1) 以下の(a)～(d)のいずれかに記載のエストロゲンレセプターをコードする遺伝子(以下、本発明遺伝子と記す。)、

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(c) 配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

(d) 配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター。

2) 配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424～1941で表される塩基配列、または配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、

3) 本発明遺伝子を含有するベクター(以下、本発明ベクターと記す。)

4) 宿主細胞内で複製可能なベクターに本発明遺伝子を組込むことを特徴とするベクターの製造方法、

5) 本発明遺伝子が宿主細胞に導入される形質転換体(以下、本発明形質転換体と記す。)、

6) 本発明遺伝子または本発明ベクターを宿主細胞に導入することを特徴とする形質転換体の製造方法、

7) 本発明形質転換体を培養してエストロゲンレセプターを産生させることを特徴とするエストロゲンレセプターの製造方法、

8) 配列番号1または配列番号4のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、

9) 配列番号1または配列番号4のいずれかで示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター、

10) 本発明遺伝子を発現し、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子が導入されている形質転換体と、被験物とを接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する工程を含む被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の評価方法、

11) リガンド依存的にエストロゲンレセプターに結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター

4
 結合領域と、エストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域とがリガンド依存的に複合体を形成することによりレポーター遺伝子の転写が活性化されるツウハイブリッドシステムにおいて、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を測定するための本発明遺伝子の使用、

12) 前項8)または9)記載のエストロゲンレセプターと被験物とを接触させ保温する工程を含むレセプターバインディングアッセイを提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子としては、具体的には例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをコードする遺伝子、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424～1941で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子、配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を有するエストロゲンレセプター遺伝子等をあげることができる。ここで、「配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、約400アミノ酸残基以上からなる領域において配列番号1で示されるアミノ酸配列と約95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるエストロゲンレセプターと実質的に同等の特性のレセプター機能を有するエストロゲンレセプターをあげることができる。また、「配列番号4で示されるアミノ酸配列に対して95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有するエストロゲンレセプター」としては、例えば、約400アミノ酸残基以上からなる領域において配列番号4で示されるアミノ酸配列と約95%以上のアミノ酸同一性を示すアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号4で示されるアミノ酸配列からなるエストロゲンレセプターと実質的に同等の特性のレセプター機能を有するエストロゲンレセプターをあげることができる。レセプター機能は、例えば、後述のレポーターアッセイ、ツウハイブリッドシステム、レセプターバインディングアッセイ等に基づき評価することができる。また、かかるエストロゲンレセプターのアミノ酸配列において認められる、配列番号1で示されるアミノ酸配列または配列番号4で示されるアミノ酸配列とのアミノ酸の相違とは、アミノ酸の欠失、置換、付加等であって、これらには、動物の系統、個

体、器官、組織等の違いに基づくアミノ酸配列の違いなどの天然に生ずる多型変異も含まれる。このようなエストロゲンレセプターをコードする遺伝子としては、天然の遺伝子であってもよいし、例えば、部位特異的変異導入法や突然変異処理等によって、天然の遺伝子に変異を導入することにより作出された遺伝子であってもよい。

【0005】本発明遺伝子は、例えば、魚類ブルーギル(学名: *Lepomis centrarchida*)等の組織から、J. Sambrook, E. F. F. Frisch, T. Maniatis 著; モレキュラー クローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリングハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory 発行、1989年)等に記載の遺伝子工学的の方法に準じて取得することができる。具体的には例えば、まず、ブルーギルの組織由来の全RNAを調製する。ブルーギルの肝臓等の組織を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の蛋白質変性剤を含む溶液中で粉砕し、さらに該粉砕物にフェノール、クロロホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる。変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された上清画分から塩酸グアニジン/フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート/CsCl法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えばISOGEN (ニッポンジーン製) や Trizol 試薬 (Life Technologies 社製) がある。得られた全RNAを鋳型としてオリゴdTプライマーをRNAのポリA配列にアニールさせ、逆転写酵素により本鎖cDNAを合成し、次いで該一本鎖cDNAを鋳型とし、かつ大腸菌RNase Hを用いてRNA鎖にニックとギャップを入れることにより得られるRNA断片をプライマーとして大腸菌のDNAポリメラーゼIを用いて二本鎖のcDNAを合成する。更に該二本鎖cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製、回収する。なお、これらの方法に基づいた市販のキットとしては、例えばcDNA合成システムプラス (アマシャムファルマシバイオテック社製) や Time Saver cDNA合成キット (アマシャムファルマシバイオテック社製) 等がある。次に、得られたcDNAを例えば、プラスミドpUC118やファージλgt10などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2または配列番号5のいずれかで示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNAをプローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2または配列番号5のいずれかで示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとし

て用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。ハイブリダイゼーション法に用いられるプローブとしては、例えば、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424~483、871~924または1863~1881で表される塩基配列を有するDNAや、配列番号5で示される塩基配列の塩基番号182~217で表される塩基配列を有するDNA等があげられる。また、ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、6×SSC (0.9M NaCl, 0.09Mクエン酸ナトリウム)、5×デンハルト溶液 [0.1w/v%フィコール400、0.1w/v%ポリビニルピロリドン、0.1%BSA]、0.5w/v%SDS及び100μg/ml変性サケ精子DNA存在下、または100μg/ml変性サケ精子DNAを含むDIG EASY Hyb溶液 (ペーリンガー・マンハイム社) 中で、65℃で保温し、次いで1×SSC (0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に、室温で15分間の保温を2回行い、さらに0.1×SSC (0.015M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム) および0.5%SDS存在下に、68℃で30分間保温する条件等とすることができる。PCR法に用いられるプライマーとしては、例えば、約20bpから約40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が約40%から約60%程度の塩基配列を、配列番号2または配列番号5のいずれかで示される塩基配列の5'非翻訳領域および3'非翻訳領域からそれぞれ選択し、5'非翻訳領域から選択した塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび3'非翻訳領域から選択した塩基配列に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成するとよい。具体的には例えば、フォワードプライマーとして配列番号6で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用し、リバープライマーとして配列番号7で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用する組み合わせがあげられる。PCRの条件としては、例えば、反応液50μl中に、10xLTAaq緩衝液 (宝酒造社製) 5μl、2.5mM dNTP混合液 (各2.5mMのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTPを含む)、8μl (dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP各々の終濃度が0.4mM)、25mM MgCl₂溶液5μl、10μMプライマー 各0.5~2.5μl (終濃度が0.1~0.5μM)、鋳型cDNA 0.1~1μg、LTAaq polymerase (宝酒造社製) 2.5ユニットを含む組成の反応液にて、94℃で1分間、次に55℃で2分間、更に72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを全30サイクル行う等の条件が挙げられる。このようにして得られた本発明遺伝子は、例えば、J. Sambrook, E. F. Frisch, T. Maniatis 著; モレキュラー クローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd

edition)、コールドスプリング ハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 発行、1989年等に記載の遺伝子工学的的方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えば、TAクローニングキット (Invitrogen社) や pBluescript II (Stratagene社) などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号5で示される塩基配列に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984) 等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam Gilbert法 (例えば、Maxam, A. M. & W. Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977等に記載される) や Sanger法 (例えば Sanger, F. & A. R. Coulson, J. Mol. Biol., 94, 441, 1975; Sanger, F. & Nicklen and A. R. Coulson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463, 1977等に記載される) 等により確認することができる。

【0006】このようにして取得された本発明遺伝子を、形質転換させる宿主細胞において利用可能なベクター、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの分離、精製が可能であり、検出可能なマーカーをもつベクター (以下、基本ベクターと記す。) に、通常の遺伝子工学的的手法を用いて組み込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができる基本ベクターとしては、具体的には微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えばプラスミド pUC119 (宝酒造社製) や、ファージミド pBluescript II (Stratagene社製) 等を用いることができる。出芽酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミド pGBT9、pGAD424、pACT2 (Clontech社製) などをあげることができる。また、哺乳動物細胞を宿主細胞とする場合は pRC/RSV、pRC/CMV (Invitrogen社製) 等のプラスミド、ウシバビロウイルスプラスミド pBPV (アママッシュファルマシアバイオテック社製)、EBウイルスプラスミド pCEP4 (Invitrogen社製) 等のウイルス由来の自律複製起点を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫動物細胞を宿主細胞とする場合には、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。自律複製起点を含むベクター、例えば、上記の酵母用プラスミド pACT2 や、ウシバビロマウイ

ルスプラスミド pBPV、EBウイルスプラスミド pCEP4 などを用いて本発明ベクターを構築すると、該ベクターは宿主細胞に導入された際にエピソードとして細胞内に保持される。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組み込むには、使用するウイルスのゲノムと相同な塩基配列を含有するトランスファベクターを用いることができる。このようなトランスファベクターの具体的例としては、Pharmingen社から販売されている pVL1392、pVL1393 (Smith, G. E., Summers, M. D. et al.: Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165 (1983))、pSF B5 (Funahashi, S. et al.: J. Virol., 65, 5584-5588 (1991)) などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファベクターに挿入し、該トランスファベクターとウイルスゲノムとを同時に宿主細胞に導入すると、トランスファベクターとウイルスゲノムとの間で相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus, Adenovirus, Vaccinia virusなどのゲノムを用いることができる。より具体的には、例えばバキュロウイルスに本発明遺伝子を組み込む場合、トランスファベクター pVL1393、pVL1392 等のマルチクローニング部位に本発明遺伝子を挿入した後、該トランスファベクターのDNAとBaculovirus genome DNA (Baculogold; Pharmingen社製) とを昆虫細胞 Sf21 (ATCCから入手可能) 株にリン酸カルシウム法等により導入し、該細胞を培養する。前記Baculogold DNAを用いると、本発明遺伝子の挿入されたウイルスDNAを含有するウイルス粒子のみが宿主細胞の培養液中へ放出される。かかる組換えウイルス粒子を培養液から回収しこれをフェノール等で除蛋白処理することにより、本発明遺伝子を含有するウイルスのDNAを得ることができる。さらに、該ウイルスのDNAを、昆虫細胞 Sf21 株などのウイルス粒子形成能を有する宿主細胞にリン酸カルシウム法等により導入し、該細胞を培養することにより、前記組換えウイルス粒子を増やすことができる。一方、マウス白血病レトロウイルスなどの比較的小さなゲノムへは、トランスファベクターを利用せず、本発明遺伝子を直接組み込むこともできる。例えばウイルスベクター-DC (X) (Eli Gilboa et al., BioTechnique, 4, 504-512 (1986)) などは、該ベクター上のクローニング部位に本発明遺伝子を組み込むとよい。このようにして構築した組換えウイルスを例えば Ampli-GPE (J. Virol., 66, 3755 (1992)) などのパッケージング細胞に導入すれ

ば、本発明遺伝子の挿入されたウイルスDNAを含有するウイルス粒子を得ることができる。

【0007】本発明遺伝子の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のような基本ベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることのできる本発明ベクターを構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞において、プロモーターの制御下に本発明遺伝子が発現されるように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用されるプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプロモーター活性を示すものであって、例えば、宿主細胞が大腸菌である場合には、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター (lac P)、トリプトファンオペロンのプロモーター (trp P)、アルギニンオペロンのプロモーター (arg P)、ガラクトースオペロンのプロモーター (gal P)、tacプロモーター、T7プロモーター、T3プロモーター、λファージのプロモーター (λ-pL、λ-pR) 等をあげることができ、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合には、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期または後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MTV) プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が芽生酵母である場合にはADH1プロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有する基本ベクターを使用する場合には、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とが機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpRC/RSV、pRC/CMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクロニング部位が設けられており、該クロニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞へ導入すれば、本発明遺伝子が発現させることができる。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori (ー) のSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばCOS細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また前述の酵母用プラスミドpACT2はADH1プロモーターを有しており、該プラスミドまたはその誘導体のADH1プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えばCG1945 (Clontech社製) 等の出芽酵母内で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0008】構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することが

できる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法としては、形質転換される宿主細胞に応じた通常の導入方法を適用することができる。例えば、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrook, コールド・スプリング・ハーバー、1989年)等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等の通常の方法を用いることができる。また、哺乳動物細胞、魚類動物細胞または昆虫動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリポフェクション法等の一般的な遺伝子導入法により前記細胞に導入することができる。酵母を宿主細胞とする場合は、例えばリチウム法を基にしたYeast transformation kit (Clontech社製) などを用いて導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合には、上述のように一般的な遺伝子導入法によりウイルスDNAを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスDNAを含有する組み換えウイルス粒子を、宿主細胞へ感染させることによってもウイルスDNAを宿主細胞に導入することができる。

【0009】本発明形質転換体を選択するには、例えば、導入された本発明ベクターが有するそれぞれのマーカー遺伝子の性質に応じた方法を用いばよい。例えば、マーカー遺伝子が、宿主細胞に致死活性を示す選択薬剤に対する薬剤耐性を付与する遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターが導入された宿主細胞を培養すれば良い。薬剤耐性付与遺伝子と選択薬剤の組み合わせとしては、例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子とネオマイシンの組み合わせ、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子とハイグロマイシンの組み合わせ、プラストサイジン耐性付与遺伝子とプラストサイジンとの組み合わせなどがあることができる。また、マーカー遺伝子が宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターが導入された細胞を培養すればよい。さらに、本発明遺伝子が宿主細胞で発現させることのできる本発明ベクターを導入した場合に、は、エストロゲン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖状にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされるマーカー遺伝子の発現を指標にして目的とする形質転換体を選択すればよい。例えば、上記のような選択薬剤に対する耐性付与遺伝子をマーカー遺伝子として有する本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、該細胞を選択薬剤が添加された培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選択薬剤

耐性クローンを純化培養することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を選択することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、一過性に本発明遺伝子を導入した株と比較して、実験毎の形質転換体作製の手間を省くことができ、また、あらかじめ性質や取扱条件の確認された形質転換体を用いて試験を実施することが可能となる。

【0010】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することによりエストロゲンレセプターを産生させることができる。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養される。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーマンター（Jar Fermenter）培養、タンク培養）などが可能である。培養温度は、微生物が生ずる範囲で適宜変更できるが、例えば、約15℃～約40℃の培養温度、約6～約8の培地pHで培養するのが一般的である。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1日間～約5日間である。温度シフト型やIPTG誘導型等の誘導型のプロモーターを有する発現ベクターを用いた場合には誘導時間は1日以内が望ましく、通常数時間である。また、上記形質転換体が哺乳類、魚類、昆虫類等の動物細胞である場合、該形質転換体は一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養することができる。選抜薬剤を利用して当該形質転換体を作製した場合は、該選抜薬剤の存在下に培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば終濃度が10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地（ニッスイ社製等）を用いて37℃、5%CO₂存在下の条件で数日ごとに新しい培養液に交換しながら培養すればよい。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、例えば0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を加えて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しいシャーレに播種し培養を続ける。昆虫類動物細胞の場合も同様に、例えばGrace's medium + 10v/v% FBS + 2w/v% Yeastolate等の昆虫細胞用培養液を用いて培養温度25℃から35℃で培養すればよい。この際、Sf21細胞などのシャーレからはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液を用いずベッティングにより分散させ継代培養を行うことができる。また、Baculovirus等ウィルスベクターを含む形質転換体の場合は、培養時間は細胞質効果が現れて細胞が死滅する前、例えばウィルス感染後72時間までとするのが好ましい。本発明形質転換体により産生されたエストロゲンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行えば良く、例えば、培養終了後、形

質転換体の細胞を選心分離等で集め、集められた該細胞を通常のバッファー、例えば20mM HEPES pH7, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSFからなるバッファーに懸濁した後、ポリトロン、超音波処理、ダウンスホモジナイザー等で破砕し、破砕液を数万×gで数十分間から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロゲンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロゲンレセプターを回収することもできる。この際、エストロゲン応答配列すなわエストロゲンレセプターが結合する塩基配列を含む15bpから200bp程度の長さのオリゴヌクレオチドをプローブとしたDNA結合アッセイなどにより、本発明のエストロゲンレセプターを含む画分を見分けることもできる。このようにして製造された本発明のエストロゲンレセプターは、例えば、被験物のエストロゲンレセプターに対する結合能・結合量を評価するためのレセプターバインディングアッセイ等に用いることができる。

【0011】本発明遺伝子は、例えば、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するためのレポーターアッセイに利用することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアロニスト活性、アンタゴニスト活性等があげられる。本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイにおいて使用される「エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子」とは、具体的には、例えばエストロゲン応答配列を含むアラルツメガールのピテロジェニン遺伝子の転写制御領域等の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメラ遺伝子、またはエストロゲン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを連結させたキメラ遺伝子などであり、宿主細胞内でのエストロゲンレセプターの転写調節能をモニターするために利用される遺伝子である。このようなキメラ遺伝子作製に用いられるレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子、GFP（Green Fluorescent Protein）遺伝子、BFP（Blue Fluorescent Protein）遺伝子などを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高いレポーター蛋白質をコードする遺伝子が好ましい。例えば、まず、本発明遺伝子と、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子とを、エストロゲンレセプター非内在性宿主細胞、具体的には例えばHeLa細胞、Cv-1細胞、Hepal細胞、NIH3T3細胞、HepG2細胞、COS1細胞、BF-2細胞、CHH-1細胞

等に導入し形質転換体を取得する。ここで、本発明遺伝子は、例えば、宿主細胞で機能可能なプロモーターと機能可能な形で結合してベクターに組み込み、上記細胞に導入する。エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子も、ベクターに組み込んで導入する。また例えば、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子が組み込まれたベクター、本発明ベクターおよびマーカー遺伝子を同時に宿主細胞に導入し、マーカー遺伝子の発現を指標にして形質転換体を選択することにより、エストロゲン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子、及び本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得しても良い。該形質転換体の遺伝子保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、これをいったん取得すると、アッセイのたび毎にこれら遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要がなく、また、形質転換体の性能も一定に保つことができることから、例えば自動化されたロボットによる大規模スクリーニングを実施する際にも有用である。上述のように作製された形質転換体を、例えば1日間から数日間培養する間に、被験物を培地中に加えて前記形質転換体と接触させ、該形質転換体における前記レポーター遺伝子の発現量を測定する。該形質転換体が産生するエストロゲンレセプターが被験物のエストロゲン様活性物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子の転写が促進され、レポーター遺伝子にコードされた蛋白質が形質転換体の細胞内などに蓄積されるかもしは培地中に分泌される。この蛋白質の量を測定することにより、該形質転換体の細胞あたりのレポーター遺伝子の発現量を測定する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合は、細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量を知ることができる。同様にして、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下におけるレポーター遺伝子発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体に17β-エストラジオール(以下、E2と記す。)等のエストロゲンを接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定する。形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較し

て、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性機能を有すると評価することができる。

【0012】また、本発明遺伝子を、細胞内のレポーター遺伝子の発現量を指標として、該細胞における2種の融合蛋白質(two-hybrid)の複合体形成および形成された複合体の転写調節能を測定することのできる試験系(ツーハイブリッドシステム; Nishikawa et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 154, 76-83 (1999))に利用することができる。具体的には例えば、本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域とがリガンド依存的に結合することにより、レポーター遺伝子の転写が活性化されるツーハイブリッドシステムにおいて、被験物の添加によるレポーター遺伝子の発現量の増減を測定することにより、被験物のエストロゲンレセプター活性調節能を評価することができる。エストロゲンレセプター活性調節能としては、エストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、アタゴニスト活性等があげられる。かかるツーハイブリッドシステムとしては、例えば、以下の(e)~(g)記載の遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体をあげることができる。

(e) 宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されており、宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子。

(f) 宿主細胞内で機能可能なプロモーターの下流に接続されており、宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子。

(g) (e)記載のDNA結合領域が結合可能な塩基配列および(f)記載の転写活性化領域により活性化されるプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子。

宿主細胞としては、例えば、出芽酵母細胞や、HeLa細胞などの哺乳動物細胞等があげられる。本発明のエストロゲンレセプターに対する被験物の活性調節能を精度よく測定するためには、エストロゲンレセプター非内在性の細胞を使用することが好ましい。上記(e)記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域」としては、例えば、宿主細胞として出芽酵母細胞を使用する場合には、酵母由来の転写調節因子GAL4

のDNA結合領域、バクテリア由来のリプレッサーLex A等をあげることができる。これらをコードするDNAと、本発明遺伝子または本発明のエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードするDNAとを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、

(e) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」が得られる。また、(f) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写

調節因子の転写活性化領域」としては、例えば、GAL 4の転写活性化領域、大腸菌由来のB42酸性転写活性化領域等があげられる。「本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子」とは、本発明のエストロゲンレセプターとリガンドとの複合体を認識してこれに結合可能な転写共役因子であって、具体的にはSRC1/NC0A1 (Onate, S. A. ら, Science, 1995, 270, 1354), TIF2/GRIP1 (Voegel, J. J. ら, EMBO, J., 1996, 15, 3667)

などがあげられる。前記のような転写活性化領域をコードするDNAと、前記転写共役因子をコードするDNAまたは該転写共役因子のレセプター結合領域をコードするDNAとを、その塩基配列の読み枠を合わせて連結することにより、

(f) 記載の「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」を得ることができる。尚、前記キメラ遺伝子の構成を互いに

入れ替えて、「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子のDNA結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」および「宿主細胞内で機能可能な転写調節因子の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子」の組合せとしてもよい。これらのキメラ遺伝子は、それぞれ「宿主細胞内で機能可能なプロモーター」の下流に接続されており、このようなプロモーターとしては、例えば、宿主細胞が出芽酵母細胞である場合には、GAL1プロモーターのような誘導型プロモーターや、ADHプロモーターのような恒常的に発現するプロモーター等が使用される。(f) 記載のレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリフォスファターゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールテトラサイクリン抵抗性遺伝子、成長ホルモン遺伝子などを利用することができ、宿主細胞における安定性が比較的高いレポーター蛋

白質をコードする遺伝子が好ましい。かかるレポーター遺伝子は、上記DNA結合領域が結合可能な塩基配列および上記転写活性化領域により活性化され得るプロモーターの下流に接続される。例えば、GAL4のDNA結合領域が結合可能な塩基配列としては、GAL1プロモーターのGAL4結合領域をあげることができ、Lex Aが結合可能な塩基配列としては、Lex A結合領域があげられる。また、GAL4の転写活性化領域により活性化され得るプロモーターとしては、例えば、酵母由来の最小TATA box配列があげられる。上述のようなキメラ遺伝子およびレポーター遺伝子を、例えばそれぞれベクターに挿入し、それらを宿主細胞に導入して形質転換体を取得する。尚、宿主細胞が、利用可能な内在性のレポーター遺伝子を有する場合はそれを利用して良く、レポーター遺伝子の導入を省略することができる。また、ツウハイブリッドシステムを調製するための市販のキット、例えばMatchmaker Two-hybrid System (Clontech社製)、CheckMate Mammalian Two-Hybrid System (プロメガ社製)等を利用して形質転換体を調製することもできる。本発明遺伝子にコードされるエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域と、リガンド依存的に該レセプターに結合可能な転写共役因子または該転写共役因子のレセプター結合領域とがリガンド依存的に結合することにより、レポーター遺伝子の転写が活性化されるツウハイブリッドシステムの構成の一例としては、例えば、下記の

(h) および (i) 記載の遺伝子が、内在性のGAL1 UAS (upstream activating sequence) および酵母由来の最小TATA box配列の下流に接続されてなるLacZ遺伝子(レポーター遺伝子)を有する出芽酵母Y190株(Clontech社製)に導入された形質転換体をあげることができる。

(h) ADH1プロモーターの下流に接続されており、GAL4のDNA結合領域と、本発明のエストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子。

(i) ADH1プロモーターの下流に接続されており、GAL4の転写活性化領域と、本発明のエストロゲンレセプターにリガンド依存的に結合可能な転写共役因子TIF2またはTIF2のレセプター結合領域との融合蛋白質をコードする塩基配列からなるキメラ遺伝子。上述のように作製された形質転換体を、例えば数時間から数日間培養する間に、被験物を培地に加えて前記形質転換体と接触させ、エストロゲンレセプターまたは該レセプターのリガンド結合領域と、転写共役因子または該因子のレセプター結合領域との結合を惹起させ、その結果形成される上記2種の融合蛋白質の複合体の転写調節能を前記レポーター遺伝子の発現量を指標にして測定

する。具体的には、例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合には、被験物を接触させた形質転換体から調製された細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると、細胞粗抽出物中のルシフェラーゼ量に比例した強度で発光する。従って、この発光強度をルミノメーターなどの測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼの量、ひいては、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量を知ることができる。同様に、形質転換体に被験物を接触させない条件下におけるレポーター遺伝子の発現量を測定し、該発現量と、被験物を接触させた条件下における発現量とを比較することにより、被験物中のエストロゲン様活性物質のエストロゲンレセプターに対するアゴニスト活性、すなわち、該レセプターの活性化能を評価することができる。また、例えば、上記の形質転換体にE2等のエストロゲンを接触させた条件下、および、該エストロゲンと被験物とを同時に接触させた条件下にそれぞれ上記と同様の方法でレポーター遺伝子の発現量を測定し、形質転換体にエストロゲンを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量と比較して、エストロゲンと被験物とを接触させた条件下におけるレポーター遺伝子の発現量が低ければ、この被験物はエストロゲンレセプターに対するアンタゴニスト活性、すなわち、該レセプターの抗活性化能を有すると評価することができる。

【01013】本発明のエストロゲンレセプターを用いたレセプターバインディングアッセイは、該エストロゲンレセプターに対する化学物質の結合能の測定や結合量の定量的ほか結合特異性、結合力の分析などが可能な試験方法である。例えば、上述のようにして本発明形質転換体から回収された本発明のエストロゲンレセプターに、標識されたリガンド（以下、標識リガンドと記す。）が結合しているところへ、被験物を共存させると、被験物と標識リガンドとの競合から、両者のレセプターへの親和性に応じて、標識リガンドがレセプターから遊離し、レセプターに結合した標識リガンドの量が減少し、よってレセプターに結合した標識量が減少する。従って、遊離型の標識リガンドの標識量または結合型の標識リガンドの標識量をモニターすることにより、被験物のレセプターへの結合能が間接的にわかる。標識リガンドとしては、例えば、トリチウム標識されたE2等を用いることができる。標識リガンドの結合型/遊離型の分離はヒドロキシアパタイト法やグリセロール密度勾配超遠心法などで行うことができる。反応系は大きく3群にわけられる。一つの系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ溶媒のみが添加される群であり、被験物の濃度がゼロの系に相当し、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する総結合量を示す。もう一つの系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、例えば、標識されていないE2

が、レセプターを十分飽和し標識リガンドが結合できなくなるだけの濃度（例えば $10\mu\text{M}$ ）となるよう添加された系であり、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、標識リガンドのエストロゲンレセプターに対する非特異的な結合量と判断される。したがって、エストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量は、総結合量からこの非特異的結合量を引いた値となる。3番目の系は、エストロゲンレセプターに標識リガンドが結合しているところへ、被験物が、例えば最終濃度 $10\mu\text{M}$ （この濃度は目的により任意に変更する。）となるよう添加された系である。被験物がエストロゲンレセプターへの結合能を有する場合は、この系から得られる結合型の標識リガンドの標識量は、上記のようにして求めた被験物濃度がゼロの時のエストロゲンレセプターへの標識リガンドの特異的結合量より小さくなる。このようにしてレセプターバインディングアッセイを行うことにより、本発明のエストロゲンレセプターに対する被験物の結合能を調べることで、被験物が複数の物質を含む場合にはその中にエストロゲンレセプターに親和性を示す物質が存在するかどうかを調べることもできる。さらに、本発明のエストロゲンレセプターに対する被験物の結合能をより詳細に評価するには、例えば前記の3番目の系における被験物の添加濃度を変えて同様にアッセイを行い結合型の標識リガンドの標識量を測定する。該測定値に基づき、各アッセイにおける結合型と遊離型のリガンド量を算出して、例えばスクキャッチャード解析を行うことにより、被験物と本発明のエストロゲンレセプターとの結合親和性、結合特異性、結合容量等を評価することができる。

【01014】本発明のレポーターアッセイ、ツーマイブリッドシステムおよびレセプターバインディングアッセイは、化学物質の安全性評価や、環境中のエストロゲン様活性物質の検出等に利用することができる。

【01015】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるものではない。

【01016】実施例1（本発明遺伝子の取得）

（1）本発明遺伝子の取得用プローブの作製

ブルーギルの肝臓約 100mg から、Trizol試薬（Life Technologies社製）を用いて添付マニュアルに従い全RNAを抽出した。この全RNAの約 $1\mu\text{g}$ とThermoScript RT-PCR system（Life Technologies社製）を用いてcDNAライブラリーを作製した。次に配列番号8で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号9で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、上記のように調製されたcDNAを鋳型としてPCR（ 94°C 1分間、 45°C 1分

間さらに74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクルを行った。増幅された約1kbpのDNAを、pBluescript IISK (+)ベクター (Stratagene社製)のEcoRV部位を用いて作製したTAクローニングベクターにサブクローニングし、ベクターに挿入されたDNAの塩基配列を解析した。その結果から、配列番号3で示される塩基配列を有するDNAを取得した。該DNAが挿入されたベクターのDNA約2μgを制限酵素EcoRIおよびSalIで消化し、1%アガロースゲル電気泳動に供して分離した後、約1kbのDNAをゲルから回収した。得られたDNAに、AlkPhos Direct system (アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いて耐熱性アルカリフォスファターゼを直接標識することにより、プローブを調製した。

【0017】(2) cDNAライブラリーの作製
ブルーギル肝臓組織より、フェノールクロロホルム-イソamilアルコール法 (Plant Cell Physiol. 36 (1) : pp85-93 (1995)) に準じて全RNAを調製した。全RNAの収量は約2.8mgであった。全RNA約500μgより、Oligotex (dT) 30-Super (宝酒造社製)を用いて、poly (A)⁺RNAを調製した。poly (A)⁺RNAの収量は約10μgであった。次にGubler and Hoffman法に基づいてcDNAライブラリーを作製した。まず2.4μgのpoly (A)⁺RNA、Oligo (dT) 18-リンカープライマー ((GA)₁₀ACGCGTCGACTCGACGCGCGCCGCGGACCG (T)₁₈, XhoI認識配列を含む。)、RAV-2 RTase (宝酒造製)およびSuperScript II RTase (Gibco-BRL社製)を用い、5-methyl dCTPを添加して1本鎖cDNAを合成した。得られた1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成した後、その末端を平滑化し、EcoRI-NoI-BamHIアダプター (宝酒造社製 code 4510)をライゲーションした。該DNAを制限酵素XhoIで消化して、スピンカラムに供して低分子量DNAを除去した後、EcoRIおよびXhoIで消化したλZAP IIとライゲーションを行った。得られたDNAとin vitro packaging kit (Stratagene社製)を用いて、in vitro packagingを用い、cDNAライブラリーを得た。該ライブラリーについて、宿主に大腸菌XL1 Blue MRF⁺株 (Stratagene社製)を用いてタイトレーションを行ったところ、青色コロニーと白色コロニーの出現率がインサート含有率は約95%と推定された。

【0018】(3) 本発明遺伝子β-gera⁺の取得
実施例1(2)で調製されたcDNAライブラリーを大腸菌XL1 BlueMRF⁺株に導入し、直径150

mmのLBプレート(1% Bacto-Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% agar)に約50,000クローンずつプレーティングしてプラークを形成させた。このプレートを合計6枚準備して、合計300,000クローンを以下のスクリーニングに供した。各プレートから、Hybond N+メンブレン (アマシャムファルマシアバイオテック社製)にファージDNAをうつし、該メンブレンを変性液(1.5M NaCl, 0.5N NaOH)に5分間、次いで中和液(1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl (pH7.2), 1mM EDTA)に10分間浸した後、乾燥させた。このメンブレンを80℃で2時間保温した後、上記のプローブを用いて、AlkPhos Direct systemのプロトコールにしたがってハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。すなわち、前記メンブレンを0.5M NaClを含むハイブリダイゼーション溶液 (アマシャムファルマシアバイオテック社製, 5ngプローブ/ml)に浸し、55℃、16時間保温した。次いで、メンブレンを、一次洗浄バッファー (2M尿素, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂および0.2%ブロッキング試薬を含む50mM ナトリウムリン酸緩衝液, pH7.0) 中にて60℃、10分間保温した後、再度、一次洗浄バッファー中にて65℃、10分間保温した。さらに、二次洗浄バッファー (100mM NaClおよび2mM MgCl₂を含む50mMナトリウムリン酸緩衝液) 中にて室温、5分間の洗浄を2回行った。洗浄後のメンブレンについて、AlkPhos Direct systemに含まれるCDP-Starを基質として、アルカリフォスファターゼ酵素による化学発光システムにより、シグナルの検出を行った。フィルムにはHyperfilm ECL (アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いた。シグナルの強いものから順に10個の陽性クローンを選択し、それぞれ滅菌済チップを用いて採取し、SMバッファー (50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, MgSO₄・H₂O, 0.01%ゼラチン)に懸濁して、4℃にて保存した。該陽性クローンをそれぞれ培養して直径約90mmのLBプレートに1,000~1,500クローンずつプレーティングして(合計10プレート)プラークを形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング作業を行った。その結果、前記の10陽性クローンのうち、3クローンについて陽性のシグナルが得られたため該陽性クローンを採取した。次いで、これら3陽性クローンを培養して直径約90mmのLBプレートに約200クローンずつプレーティングしてプラーク形成させ、前記と同様に、ハイブリダイゼーションによるスクリーニング作業を行った。このスクリーニングでも陽性のシグナルが得られたクロー

ーンを単一クローンとして単離した。該陽性クローンの保有するベクターから、 λ ZAPIベクターキット（ストラタジーン社製）添付のプロトコルに従って *in vivo excision system* を用いることにより、該ベクターに挿入されたDNAがpBluescript SK (-) のEcoRI部位とXhoI部位との間にクローニングされたプラスミドを得た。該プラスミドにクローニングされたDNAについて、Primer Walking法により、塩基配列の解析を行った。その結果、該DNAは配列番号2で示される塩基配列を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードしていることが判明した（以下、該アミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをBGER α と記し、当該レセプターをコードする遺伝子を本発明遺伝子bger α と記す。また、前記プラスミドをpBSBGER α と名付けた。）。プラスミドpBSBGER α が導入された大腸菌DH5 α 株（Escherichia coli DH5 α /pBSBGER α ）は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号；FERMBP-6876として寄託されている。

【0019】（4）本発明遺伝子bger α 2の取得
ブルーギルの肝臓約100mgから、Trizol試薬（Life Technologies社製）を用いて添付マニュアルに従い全RNAを抽出した。得られた全RNAの約1 μ gとThermoScript RT-PCR system（Life Technologies社製）を用いてcDNAライブラリーを作製した。一方、配列番号10で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号11で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを合成した。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして、LA-Taq（宝酒造製）を用いてPCR（94℃ 1分間、60℃ 1分間、74℃ 0.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル）を行いDNAを増幅した。増幅されたDNAは、3% NuSieve 3:1アガロースゲル（FMCバイオプロダクツ社製）を用いて電気泳動した。その結果、長さの異なる2種のDNAが検出された。それぞれのDNAをゲルから回収しダイレクトシーケンスに供した。長い方のDNAは、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有しており、一方、短い方のDNAは、該部分塩基配列から配列番号12で示される塩基配列が欠失した塩基配列を有していた。そこで、上記のブルーギル肝臓由来のcDNAを鋳型として、配列番号13で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号7で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとをプライマーとして、LA-Taq（宝酒造製）を用いてPCR（94℃ 1分間、75℃ 1分間、74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル）を行った。増幅された約2.0 kbpのDNAをTAクローニングベクター

（pGEM-T、プロメガ社製）を用いて当該製品マニュアルに準じてクローニングを行い、得られた複数個のクローンの保有するベクターDNAの塩基配列を確認した。その結果、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号424～1941で表される塩基配列を有するDNA、および配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74～1819で表される塩基配列を有するDNAが得られた。配列番号5で示される塩基配列の配列番号74～1819で表される塩基配列は、配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードしていることが判明した（以下、該アミノ酸配列を有するエストロゲンレセプターをBGER α 2と記し、当該レセプターをコードする遺伝子を本発明遺伝子bger α 2と記す。）。

【0020】実施例2（本発明遺伝子bger α を含有する動物細胞発現用の本発明ベクターの構築）
RSVプロモーターを有する発現プラスミドpRc/RSV（Invitrogen社）2 μ gを、制限酵素XbaI（10U）で、37℃にて終夜消化し、さらにアルカリフォスファターゼ（BAP）5Uを65℃にて1時間反応させた。これをアガロース（アガロースS；ニッポンジーン社製）ゲルを用いた電気泳動に供し、5～6 kbpの長さを示すバンド部分からジーンクリーン（フナコシ社製）を用いてDNAを回収し、ベクターDNAとした。一方、実施例1（3）で取得されたプラスミドpBSBGER α のDNAを鋳型として、配列番号14で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと、LA-Taq（宝酒造製）を用いてPCR（94℃ 1分間、75℃ 2分間、74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル）を行いDNAを増幅した。増幅されたDNAをクロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させ、TEを加えて溶解させた後、制限酵素XbaIで37℃で5時間消化した。次いで、該消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1.5 kbpのDNAを含む部分部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン（フナコシ社製）を用いて精製した。その約100 ngを上記のように調製したベクターDNA 50 ngと混合し、5UのT4 ligaseを添加して16℃にて3時間保温した。この反応液を大腸菌 DH5 α 株コンピテントセル（TOYOBO社製）に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドDNAの塩基配列を解析し、RSVプロモーターの下流に連結された本発明遺伝子bger α を有するプラスミドをpRc/RSV-BGER α と名付けた。

【0021】実施例3（本発明遺伝子bger α 2を含有する動物細胞発現用の本発明ベクターの構築）

実施例2で作製されたBGER α 発現プラスミドpRc/RSV-BGER α のうち2 μ gを、制限酵素Hind III (10 U) で、37℃にて終夜消化し、さらにアルカリフォスファターゼ (BAP) 5 Uを65℃ 1時間反応させた。これをアガロース (アガロースS; ニッポンジーン社製) を用いたゲル電気泳動に供し、5~6 kbpの長さを示すバンド部分からジーンクリーン (フナコシ社製) を用いてcDNAを回収しベクターDNAとした。一方、実施例1 (4) で調製されたcDNAを鋳型として、配列番号16で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドおよび配列番号15で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを用いてLA-Taq (宝酒造製) にてPCR (94℃ 1分間、次に55℃ 2分間、さらに74℃ 2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル) を行い本発明遺伝子のDNAを増幅した。これをクロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させ、TEを加えて溶解させた後、制限酵素Hind IIIで37℃で終夜消化した。次いで、該消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1.0 kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン (フナコシ社製) を用いて精製した。その約100 ngを上記のように調製したベクターDNA 50 ngと混合し、5 UのT4 ligaseを添加して16℃にて3時間保温した。この反応液を大腸菌 DH5 α 株コンピテントセル (TOYOBO社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドDNAの塩基配列を解析し、RSVプロモーターの下流に、配列番号5で示される塩基配列の塩基番号74~1819で表される塩基配列を含むプラスミドを選択して、これをpRc/RSV-BGER α 2と名付けた。

【0022】実施例4 (本発明遺伝子を用いたレポーターアッセイ)

(1) レポーターアッセイ用のレポータープラスミドの作製

Isogen試薬 (ニッポンジーン社製) を用いて該試薬に添付のプロトコールに記載の方法で、アフリカツメガールのゲノムDNAを精製した。該ゲノムDNAを鋳型として、Walkerらの報告 (Nucleic Acid Res. (1984) 12, 8611-8626) に準じてPCRを行なうことにより、アフリカツメガールピテロゲン遺伝子上流のTATA boxからエストロゲンレセプター応答配列までを含むDNAを増幅した。増幅されたDNAを回収し、その末端をBlunting kit (宝酒造製) を用いて平滑化した (該DNAを、以下、ERE DNAと記す)。配列番号17で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号18で示される塩基配列からなるオ

リゴヌクレオチド [マウスメラノチオネインI遺伝子のTATA box近傍の塩基配列とリーダー配列 (Genbank Accession No. J00605) に由来する] をアニーリングさせて2本鎖DNAとし、これにT4ポリヌクレオチドカキネースを用いてその両末端をリン酸化した (該DNAを、以下、TATA DNAと記す)。一方、ホタルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミドpGL3 (プロメガ社製) を制限酵素Bgl IIおよびHind IIIで消化した後、これにBacterial alkaline phosphatase (BAP) を加えて65℃で1時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース (Agarose L; ニッポンジーン社製) を用いた電気泳動に供し、pGL3由来のシフェラーゼ遺伝子を含むBgl II-Hind III断片の長さに対応する泳動度を示すDNAを回収した。該DNA約100 ngと、前記のTATA DNA 1 μ gとを混合し、T4リガーゼで結合させることによりプラスミドpGL3-TATAを作製した。次に、pGL3-TATAを制限酵素Sma Iで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。該DNA約100 ngと、上記 ERE DNA約1 μ gとを混合してT4リガーゼを反応させた後、該反応液をDH5 α コンピテントセル (TOYOBO社製) へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミドのDNAを調製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-TATAのSma I部位にERE DNAが1コピー導入された構造を有するプラスミドをpGL3-TATA-EREと名付け、また、前記部位にERE DNAが5コピー導入された構造を有するプラスミドをプラスミドpGL3-TATA-ERE \times 5とした。

【0023】(2) 一過性発現系によるレポーターアッセイ

HeLa細胞 約2x10⁶細胞を10 cmプレートに播種し、チャコールデキストラン処理済みFBS (以下、FBSと記す。) が10%となるよう添加されたE-MEM培地で、5%CO₂条件下37℃にて1日間培養を行った。次いで、細胞に、Lipofectamine (Life Technologies社製) を用いてそのプロトコールに従い、3.75 μ gのpRc/RSV-BGER α またはpRc/RSV-BGER α 2と、3.75 μ gのpGL3-TATA-ERE \times 5とを同時に導入した。37℃にて16日間培養後、培地を交換しさらに3時間培養した。その後、細胞を集めてFBSが10%となるよう添加されたE-MEM培地に懸濁して均一化し、予めDMSOで溶解した様々な濃度のE2 (和光純薬社製)、ジェチルスチ

ルベステロール (DES) (ナカライテスク社製)、ビスフェノールA (和光純薬社製)、ゲネステイン (和光純薬社製) または、 α , α' -DDT (Lancaster社製) を添加した96穴プレート (DMSO終濃度0.1%) に播種した。また、抗エストロゲン作用を測定するために、同様に様々な濃度の4-ヒドロキシタモキシフェンと10 nMのE2とを同時に添加した96穴プレート (DMSO終濃度0.1%) に上記細胞を播種した。細胞が播種された96穴プレートは37℃にて約40時間培養した後、5倍に希釈した細胞溶解剤PGC50 (ニッポンジーン社製) を50 μ l/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させた。このように調整された細胞溶解液を10 μ lずつ96穴白色サンプルプレート (ペルトルド社製) に採取し、基質自動インジェクター付きのルミノメーターLB96p (ペルトルド社製) で50 μ l/wellずつ酵素基質液PGL100 (ニッポンジーン社製) を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定した。pRc/RSV-BGER α を導入した細胞を用いた結果を図1~6に示し、pRc/RSV-BGER α 2を導入した細胞を用いた結果を図7~11に示す。上記のように、本発明遺伝子を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、被検物のエストロゲンレセプター活性化能または活性化阻害能を測定することができた。さらに、他の被検物を同様に試験することにより、エストロゲンレセプター活性化能を有する物質またはエストロゲンレセプター活性化阻害能を有する物質を検出することができる。

【0024】 (3) 本発明遺伝子が染色体に導入されたレポーターアッセイ用形質転換体の作製
 プラスミドpUCSV-BSD (フナコシ社から購入) をBamHIで消化し、プラストサイジンデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調整する。該DNAと、実施例4 (1) 記載のプラスミドpGL3-TATA-EREをBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌DH5 α コンピテントセル (TOYOBO社製) に導入する。得られたアンピシリン耐性的大腸菌クローンからプラスミドDNAを調整し、それぞれを制限酵素BamHIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析する。プラストサイジンデアミナーゼ遺伝子発現カセットがプラスミドpGL3-TATA-EREのBamHI切断部位に挿入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDとする。次に、ヒト由来のHeLa細胞に、上記のように作製されたプラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、本発明遺伝子がpRc/RSVに組み込まれた発現ベクターのDNAを、それぞれ直鎖化して実施例4 (2) のようにして導入し、これらのDNAが宿主細胞の染色

体導入されてなる形質転換体を取得する。まず、プラスミドpGL3-TATA-ERE-BSDのDNA、および、本発明遺伝子がpRc/RSVに組み込まれた発現ベクターのDNAをそれぞれSalIで消化する。HeLa細胞は、10 v/v% FBSを含むDMEM培地 (日本製薬社製) を用いて37℃にて5% CO₂存在下に、直径約10 cmのシャーレ (ファルコン社製) を用いて培養する。約5 x 10⁵の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクション (GIBCO社製) を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドのDNAを同時に導入する。リポフェクション法の条件はリポフェクションに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNAの総量7 μ g (各々3, 5 μ g) /シャーレ、リポフェクション量は20 μ l/シャーレとする。リポフェクション後、10 v/v% FBSを含むDMEM培地中でそのまま3日間培養する。次に、細胞をトリプシン処理でシャーレから剥がし、1/10量ずつ新しい10枚のシャーレに播種し、そのまま翌日まで培養する。次に、G418 (SIGMA社製) を最終濃度400 μ g/mlとなるように、および、プラストサイジンを最終濃度8 μ g/mlとなるように培養液に添加し、培養を継続する。一週間後、G418およびプラストサイジンを前記と同じ濃度含む新しい培地に交換し、更に培養を継続する。一週間後、同じ操作を再度行う。さらに一週間後、倒立顕微鏡でシャーレを観察し、出現した直径数mmのコロニーを30コロニー、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュースプレート (ペルトルド社製) にコロニーごと移し、さらに培養を続ける。細胞をコンフルエントになる前にトリプシン処理により剥がして回収し、3等分して3枚の新しい96穴ビュースプレートに播種する。1枚はそのまま稀化と培養を続け、残り2枚の内の一方には最終濃度50 nMとなるようE2を加え、もう一方には未添加とし、それぞれを2日間培養する。2日後、それぞれの培養上清を除き、200 μ l/wellのPBS (-) で細胞を2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50 (ニッポンジーン社製) を20 μ lずつ加えて、室温に30分間放置し細胞を溶解させる。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96p (ペルトルド社製) にそれぞれセットし、50 μ lの基質液PGL1000 (ニッポンジーン社製) を自動分注しながら、ルシフェラーゼ活性を測定する。E2が添加された系の方が、E2が添加されていない系に比べ、2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す形質転換体を選択する。

【0025】 (4) 本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いるレポーターアッセイ
 実施例4 (3) に記載のようにして作製されるHeLa細胞の形質転換体を24穴プレートに約4 x 10⁴細胞/wellずつ播種し、チャコールデキストラン処理済

みの10v/v%FBS、400μg/mlのG418および8μg/mlのブラスミジンSを含むE-MEM培地(以下、FBSおよび抗生物質含有E-MEM培地と記す。)で、5%CO₂条件下37℃にて1日培養を行う。被験物をDMSO(和光純薬社製)に溶解させ最終濃度が1nMから50μMとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、前記の被験物溶解液と同量のDMSOを添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地、及びE2をDMSOに溶解させ最終濃度1μMとなるよう添加したFBSおよび抗生物質含有E-MEM培地を調製し、これを前記の細胞の培養上清と交換する。該細胞をCO₂インキュベーター中で培養し、24時間後に培養上清を除き、ウェルに接着している細胞を剥がさないように1ml/ウェルのPBS(-)でウェルを2回洗浄し、5倍に希釈した細胞溶解液PGC50(ニッポンジーン社製)を50μl/wellずつ加えて、時々軽くゆすりながら室温にて30分間放置して細胞を溶解させる。このように調製された細胞溶解液を10μlずつ96穴白色サンプルプレート(バルトールド社)に採取し、基質自動インジェクター付きのミノモーターLB96p(バルトールド社製)で50μl/wellずつ酵素基質溶液PGL100(ニッポンジーン社製)を添加しながら直ちに発光量を5秒間測定する。このような本発明遺伝子が染色体に導入された形質転換体を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによって、エストロゲンレセプター活性化能を有する物質を含む被験物を見出すことができる。

【0026】実施例5(本発明遺伝子を利用したツーマイブリッドシステム)

(1)本発明のエストロゲンレセプターのリガンド結合領域と転写調節因子のDNA結合領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子含有するベクターの作製
本発明遺伝子bgerαを含有するプラスミドpBSBGERαを鋳型として、配列番号19で示される塩基配列からなるプライマー及び配列番号20で示される塩基配列からなるプライマーとLA-Taq(宝酒造製)を用いて添付マニュアルに従いPCR(94℃1分間、次いで55℃1分間さらに74℃1.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル)を行い、本発明のエストロゲンレセプターのリガンド結合領域をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNAは、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。このDNAにTEを加えて溶解させた後、制限酵素EcoRIとSalIとで37℃で約5時間消化した。消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約1100bpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン(フナコシ社製)を用いて添付マニュアルに従い回収した。一方、GAL4蛋白のDNA結合領域との融合蛋白質作製用ベクターpGBT

9(Clontech社製)(約50ng)をEcoRIおよびSalIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して、EcoRIおよびSalIで消化されたベクターDNAをジーンクリーン(フナコシ社製)を用いて回収した。該ベクターDNAと前記回収DNA約10ngとを混合し、同容量のライゲーション液(宝酒造製ライゲーションキット)を加え、16℃で約1時間保温し、次いでコンピテントセルDH5α(TOYOBO社製)に添付説明書に記載の方法に従って導入し、アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した後、pGBT9-BGERαLIDと名付けた。上記のプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツーマイブリッドシステムに使用することができる。

【0027】(2)転写共役因子のレセプター結合領域と転写調節因子の転写活性化領域との融合蛋白質をコードするキメラ遺伝子含有するベクターの作製
ヒト脳由来mRNA(Clontech社製)とRT-PCRキット(宝酒造製)を用いて製品添付のプロトコールに従いcDNAを作製した。作製されたcDNAを鋳型として、LA-Taq(宝酒造製)と配列番号21で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドおよび配列番号22で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCR(94℃で1分間、次いで55℃で1分間さらに72℃で2.5分間の保温を1サイクルとしてこれを30サイクル)を行い、転写共役因子TIF2のアミノ末端から624番目のアミノ酸から1287番目のアミノ酸までのアミノ酸配列をコードするDNAを増幅した。増幅されたDNAは、クロロホルム/フェノール処理の後、エタノール沈殿し、70%エタノールにより遠心洗浄した後乾燥させた。このDNAにTEを加えて溶解させた後、制限酵素EcoRIとBglIIとで37℃で5時間消化した。消化物を1%アガロースゲル電気泳動に供して分離し、約2.0kbpのDNAを含むゲル部分を切り出し、これに含まれるDNAをジーンクリーン(フナコシ社製)を用いて精製した。一方、GAL4蛋白の転写活性化領域とのキメラ蛋白作製用ベクターpGAD424(Clontech社製)(約50ng)をEcoRIおよびBamHIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供して消化されたベクターDNAをジーンクリーン(フナコシ社製)を用いて回収した。回収されたベクターDNAと前記精製DNA約10ngとを混合し、同容量のライゲーション液(宝酒造製ライゲーションキット)を加え、16℃で約1時間保温し、次いでコンピテントセルDH5α(TOYOBO社製)に添付説明書に記載の方法に従って導入した。アンピシリン耐性を示すコロニーを単離して該コロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製した。得られたプラスミドは、塩基配列を確認した

後、pGAD424-TIF2RIDと名付けた。このプラスミドは、宿主細胞として出芽酵母細胞を用いたツ－ハイブリッドシステムに使用することができる。

【0028】(3) 出芽酵母細胞を宿主細胞とするツ－ハイブリッドシステムの作製

酵母Y190 (Clontech社製) をMatchmaker Two-Hybrid System (Clontech社製) のマニュアルに従いYPD培地で終夜30℃で振盪培養した。該酵母を集菌後、その細胞内に、実施例5(1)記載のpGBT9-BGERαLIDおよび実施例5(2)記載のpGAD424-TIF2RIDを、Yeastmaker yeast transformation system (Clontech社製) を用いて導入した。前記プラスミドの導入された酵母細胞は、トリプトファンおよびロイシンを含まないSDプレート上に播き、30℃で約2日間培養する。培養後、3コロニーを選択し再びトリプトファンおよびロイシンを含まないSDプレート上に塗布し、30℃で約2日間培養した。

【0029】(4) 酵母ツ－ハイブリッドシステムを用いた被験物のエストロゲンレセプター活性調節能の測定
実施例5(3)で調製された酵母の一部をトリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地1mlに植菌し、30℃で終夜振盪培養し、得られた培養液をトリプトファンおよびロイシンを含まないSD培地で約80倍に希釈した。96穴のディープウェルプレートの各ウェルに、DMSOに溶解した様々な濃度のE2 (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製)、1μMのジェシルスチルベステロール (DES) (ナカライテスク社製)、1mMのビスフェノールA (和光純薬社製)、100μMのp-ニルフェノール (関東化学社製)、100μMのゲンステイン (和光純薬社製)、100μMのクメステロール (INDOFINE Chemical社製)、1mMのダイゼイン (シグマ社製)、1mMのメトキシクロル (和光純薬社製)、または1mMのp'-DDT (Lancaster社製) 2.5μlを加え (DMSO終濃度1%とする)、ここへ上記培養酵母希釈液を250μlを添加して、30℃で4時間振盪培養した。培養後、各ウェルから酵母液100μlを回収しこれに100μlのβガラクトシダーゼ活性測定用発光反応液 (Gal-Screen, Tropic社製) を加え、約1.5時間室温で保温した後、ルミノメーターLB96p (ベルトルド社製) で発光量を測定した。図12にE2 (和光純薬社製)、エストリオール (和光純薬社製)、エストロン (和光純薬社製) の濃度依存的な活性誘導の結果を示す。また図13に終濃度10nMのジェシルスチルベステロール (DES)、10μMのビスフェノールA、1μMのp-ニルフェノール、1μMのゲンステイン、1μMのクメステロール、10μMのダイゼ

ン、10μMのメトキシクロルおよび10μMのp'-DDTの活性誘導結果を示す。

【0030】実施例6 (本発明遺伝子含有する組換えウイルスベクター及び組換えウイルス粒子の作製)

本発明ベクターpRc/RSV-BGERαのDNA 2μgを10Uの制限酵素XbaIで、pRc/RSV-BGERα2のDNA 2μgを10Uの制限酵素HindIIIで、それぞれ37℃にて1時間消化した後、それぞれ低融点アガロースゲル電気泳動に供し約1.5~1.7 kbpのDNA断片を回収する。pRc/RSV-BGERα2由来のDNAはその約1μgを、DNAbluntingキット (宝酒造社製) で処理してその末端を平滑化し、これに次にT4ポリヌクレオチドカインースを反応させてその末端をリン酸化する。該DNAをフェノール処理した後、エタノール沈殿法により精製し、その全量を下記の発現プラスミド作製のインサートDNAとして用いる。一方、2μgのpVL1392ベクターDNAを10Uの制限酵素XbaIまたはSmaIで消化し、10Uのアルカリフォスファターゼで65℃にて1時間処理後、低融点アガロースゲル電気泳動に供しDNAを回収しそれぞれpVL1392-XbaIおよびpVL1392-SmaIとする。このpVL1392-XbaIベクターDNA 100ngに、上記のようにpRc/RSV-BGERαから調製した約1.5 kbpのDNAを約100ng加え、5UのT4 Ligaseを用いて16℃にて3時間保温する。これをE. coli DH5α株のコンピテントセル (TOYOBO社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製する。それぞれのプラスミドDNA約1μgを10Uの制限酵素XbaIで37℃にて1時間消化した後アガロースS (ニッポンジーン社製) を用いたアガロース電気泳動で分析し、約1.5 kbpのバンドが検出されるクローンを選択する。また、pVL1392-SmaIベクターDNA 100ngに、上記のようにpRc/RSV-BGERα2から調製した約1.7 kbpのDNAを約100ng加え、5UのT4 Ligaseを用いて16℃にて3時間保温する。これをE. coli DH5α株のコンピテントセル (TOYOBO社製) に添付説明書に記載の方法に従って導入し、得られたコロニーからプラスミドDNAをアルカリ法で調製する。それぞれのプラスミドDNA約1μgを10Uの制限酵素XbaIおよびHindIIIで37℃にて1時間消化した後アガロースS (ニッポンジーン社製) を用いたアガロース電気泳動で分析し、約1.7 kbpのバンドが検出されるプラスミドを選択する。該プラスミドのDNAをアルカリ法にて調製し、組換えBaculo virus作製に用いるトランスファベクターpVL1392-BGERαおよびpVL1392-BGERα2とする。1x10

6個のSf21細胞(ATCCから入手)を75cm²のT型フラスコ(ファルコン社製)中で10% FBSおよび2% Yeast plateを含むGrace's medium(以下、FBS含有Grace培地と記す。)を用いて27℃にて一晚培養する。一方、上記のように作製されるトランスファーベクターpVL1392-BGERαまたはpVL1392-BGERα2のDNA10μgと、直鎖状に調製されたウイルスゲノムDNA Baculogold(Pharming社製)20ngとをGrace's medium 100μlに添加し、滅菌水で2倍に希釈したりボフェクチン(GIBCO社製)10μlを加え、室温にて30分間放置する。一晚培養された前記のSf21細胞の培養上清を除き、血清を含まないGrace's medium少量で細胞を洗った後、同培地5mlを細胞に添加し、これに前記のボフェクチン-DNA混合液を全量加え、27℃にて3時間保温する。次いで、FBS含有Grace培地で細胞を洗った後、FBS含有Grace培地20mlを細胞に添加し、5日間27℃にて培養する。5日目に培養上清を回収して50ml容の遠心チューブに採り、5000xgで15分間遠心分離することにより細胞の破片を沈殿させ、遠心上清を回収する。この上清全量を100,000xgで24時間超遠心分離し、ウイルス粒子をベレットとして得る。このベレットを100μlのTEに懸濁し、当量のTE飽和フェノールを加え、穏やかに室温にて24時間混合した後、水層を回収し、これに当量のクロロホルムを加え10分間穏やかに混合し、再度10,000xg、10分間の遠心分離を行う。水層を回収し、該水層に終濃度0.2Mとなる量のNaClと2.5倍量のエタノールを加え、本発明遺伝子を持つウイルスベクターのDNAを沈殿として回収する。

【0031】実施例7(本発明の組換えウイルスベクターがSf21細胞へ導入された形質転換体の作製と本発明のエストロゲンレセプターの製造)
Sf21細胞(ATCCから入手)を75cm²のT型フラスコ(ファルコン社製)1x10⁶個ずつ計10枚播種し、27℃にてFBS含有GRACE培地で培養する。この細胞に、実施例6のように調製される組換えウイルス粒子を含む培養上清を10μl/フラスコの割合で加え、そのまま4日間培養する。この培養上清を採取し、前記と同様に75cm²のT型フラスコ(ファルコン社製)10枚に培養された前Sf21細胞へ、該培養上清をフラスコ一枚あたり1mlずつ加え、60時間培養する。60時間後、細胞をピッキングにより懸濁してフラスコより回収し、得られた細胞懸濁液を5,000xgで15分間遠心分離しベレットとする。この細胞のベレットを20mM HEPES pH7.1, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF

バッファーに懸濁した後、得られる細胞懸濁液をダウンスタ型ガラスホモジナイザーで上下に30回ホモジナイズし細胞を破砕する。この破砕液を30,000xgで1時間超遠心分離して上清画分を回収することにより、本発明のエストロゲンレセプターを含む画分を得る。

【0032】実施例8(レセプターバインディングアッセイ)

結合反応バッファーは、最終組成が20mM HEPES-KOH pH7.9, 10mMモリブデン酸ナトリウム, 1mM DTT, 0.5mM EDTA, 0.5mM PMSF(いずれも和光純薬社製)となるように調製する。反応系は総容量を100μlとし、本発明のエストロゲンレセプターを含む細胞抽出物を10μg蛋白質添加し、トリチウム標識されたE2を1pMから100nM程度になるよう添加する。非特異的結合を調べるための試験区には標識されていないE2を最終濃度10μMになるようにさらに加える。結合反応は、以下のように行う。反応液を水上で15時間保温した後、チャコールデキストラン液[組成:10mM Tris-HCl, 0.2%の酸洗活性炭(ナカライテック社製Norit A), 0.05%ファルマシアDextran T70]を100μl加え、10分間水上に放置する。この反応液を低速遠心機で1,000xgで10分間遠心分離して活性炭に沈殿させ、上清を100μl分取し、その放射能量を液体シンチレーションカウンターで測定する。この測定値を基に、該上清画分中の標識E2量、すなわち、レセプターに結合した標識E2量(結合型標識リガンド量)を求める。標識E2のみが添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する全結合量に相当する。一方、標識E2に加え標識されていないE2が添加された試験区の結合型標識リガンド量は、標識E2のレセプターに対する非特異的結合量に相当する。各種濃度の標識E2が添加された反応系それぞれについて、全結合量から非特異的結合量を差し引いて、その反応系における標識リガンドのレセプターに対する特異的結合量を求める。次いで、Y軸に(特異的結合標識リガンド濃度/遊離標識リガンド濃度)、X軸に特異的結合標識リガンド濃度をプロットし、スキッチャード解析することにより、本発明のエストロゲンレセプターのE2に対するKd値を求める。エストロゲンレセプターに対する被験物の親和性を測定するには、上記と同様にして1nM程度のトリチウム標識E2が入っているバインディングアッセイ結合反応液へ被験物を終濃度が1%程度となるよう添加する。なお被験物が添加されない系には、被験物と同量の溶媒を系に加える。被験物添加によりレセプターに対する標識E2の結合量が低下する場合は、その被験物にはエストロゲンレセプターに結合するような物質が含まれると判断される。

【0033】

【発明の効果】本発明により、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を評価するための試験系に利用することのできる新たなエストロゲンレセプター遺伝子等が提供可能となる。

【0034】【配列表フリーテキスト】

配列番号 6

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 7

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 8

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 9

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 10

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 11

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 12

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 13

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

* 配列番号 14

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 15

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 16

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

10 配列番号 17

プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 18

プロモーターDNAを作製するために設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 19

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 20

20 PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 21

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

配列番号 22

PCRのために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー

【0035】

【配列表】

*

<110> Sumitomo Chemical Company Limited

<120> Estrogen receptor genes

<130> P152169

<150> JP 11/318113

<151> 1999-11-09

<160> 22

<210> 1

<211> 506

40

<212> PRT

<213> Lepomis centrarchidae

<400> 1

Met	Ser	Leu	Lys	Asp	Trp	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Val	Thr
1						5				10				15	
Met	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Ser	Val	Pro	Ser	Ser	Gln	Gln	Pro	Val	Pro
						20				25				30	
Arg	Glu	Asp	Gln	Cys	Ala	Thr	Ser	Asp	Glu	Ser	Tyr	Ser	Val	Gly	Glu
						35				40				45	

35										36									
Ser	Gly	Ala	Gly	Ala	Arg	Gly	Phe	Glu	Met	Ala	Lys	Glu	Met	Arg	Phe				
50						55					60								
Cys	Ala	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Trp				
65					70					75				80					
Ser	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln	Gly	His				
				85					90					95					
Asn	Asp	Tyr	Met	Cys	Pro	Ala	Thr	Asn	Gln	Cys	Thr	Ile	Asp	Arg	Asn				
			100					105					110						
Arg	Arg	Lys	Ser	Cys	Gln	Ala	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu	Val				
			115				120					125							
Gly	Met	Met	Lys	Gly	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Arg	Gly	Arg	Val	Leu	Arg				
	130				135						140								
Arg	Asp	Lys	Arg	Arg	Ala	Gly	Thr	Asn	Asp	Arg	Glu	Lys	Ala	Ser	Lys				
145				150						155				160					
Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Val	Pro	Pro	Gln	Asp	Arg	Arg	Lys	His	Ser				
			165						170					175					
Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Gly				
			180				185						190						
Met	Ser	Pro	Asp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Pro				
		195				200						205							
Met	Leu	Cys	Ser	Arg	Gln	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Tyr	Thr	Glu	Val	Thr				
	210				215						220								
Ile	Met	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val	His	Met				
225				230						235				240					
Ile	Thr	Trp	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu	His				
			245						250					255					
Asp	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Ser	Trp	Leu	Glu	Val	Leu	Met	Ile				
		260				265							270						
Gly	Leu	Ile	Trp	Arg	Ser	Ile	His	Cys	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Phe	Ala				
		275				280						285							
Gln	Asp	Leu	Ile	Leu	Asp	Arg	Asn	Glu	Gly	Asp	Cys	Val	Glu	Gly	Phe				
		290				295					300								
Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Phe	Arg	Met				
305				310						315				320					
Leu	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Phe	Val	Cys	Leu	Lys	Ala	Ile	Ile	Leu				
			325						330					335					
Leu	Asn	Ser	Gly	Ala	Phe	Ser	Phe	Cys	Thr	Gly	Thr	Met	Glu	Pro	Leu				
		340					345						350						
His	Asn	Ser	Met	Ala	Val	Gln	Asn	Met	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp	Ala				
		355					360					365							
Leu	Ile	His	His	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Cys	Ser	Ala	Gln	Gln	Gln	Ser				
		370				375						380							
Arg	Arg	Gln	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	Arg	His	Met					
385				390						395				400					
Ser	Asn	Lys	Gly	Met	Glu	His	Leu	Tyr	Ser	Met	Lys	Cys	Lys	Asn	Lys				
			405						410					415					
Val	Pro	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Asp	Ala	His	Arg	Ile					
		420					425						430						
His	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Gln	Phe	Trp	Ser	Gln	Ala	Asp	Gly	Glu				
		435					440						445						

37		38
Pro Pro Phe Ile Asn Asn Asn Asn Ser Ser Asn Ser Gly Ser Asn Gly		
450	455	460
Gly Val Ser Ser Ser Val Gly Ser Ser Ser Gly Pro Arg Val Asn His		
465	470	475
Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Thr Gly Pro Gly Val Leu Gln Tyr Gly		
485	490	495
Gly Ser Arg Ser Asp Cys Thr His Ile Leu		
500	505	
<210> 2		
<211> 3499	10	
<212> DNA		
<213> <i>Lepomis centrarchidae</i>		
<220>		
<221> CDS		
<222> (424)... (1944)		
<400> 2		
caggcagagc ccagcgagc gcagacagcc ttgiggaaca glactcagac ccaggatcag	60	
etcagccctc acagagctgg agaccctctc cccacaacgt cccctgccc cgcctgctgc	120	
cccctcagt gacatgtaac ctgaagagag cagggggctc ggggggtag ccacigggga	180	
ctttctggaa gggacctaac attatgccgc ccccacccct gccccgactc ctctttacag	240	
ccagctcggc tactactcgt tactctggga cggccaaggc ccaccctcag atggcagcct	300	
tcagctccgt ggcagcgggc ctaccagctc tcttggtgtt gtcgcgtcca gccccagact	360	
cagccccctt atgcaccgcg ccagccacca ctactggaa accacctcaa caccgtcta	420	
cag atg agt ctg aaa gac tgg tta tta gga aaa gaa agg acg gtg gtg	480	
Met Ser Leu Lys Asp Trp Leu Leu Gly Lys Glu Arg Thr Val Val		
1 5 10 15		
acc atg gag gag ctg agg tct agt gtc cca tcc agc cag cag cca gtt	516	
Thr Met Glu Glu Leu Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Gln Gln Pro Val		
20 25 30		
ccc aga gag gac cag tgt gcc acc agt gat gag tcc tat agt gtg ggg	564	
Pro Arg Glu Asp Gln Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ser Tyr Ser Val Gly		
35 40 45		
gag tca ggg gct gga gcc agg ggg ttt gag atg gcc aag gag atg cgt	612	
Glu Ser Gly Ala Gly Ala Arg Gly Phe Glu Met Ala Lys Glu Met Arg		
50 55 60		
ttc tgt gct gtg tgc agt gac tat gcc tct ggg tac cac tac ggg gtg	660	
Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val		
65 70 75		
tgg tcc tgt gaa ggc tgt aag gcc ttc ttt aag agg agc atc cag ggt	708	
Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly		
80 85 90 95		
cac aat gac tat atg tgc cca gca acc aat cag tgt act att gac agg	756	
His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg		
100 105 110		
aat cgg aga aag agc tgc cag gct tgc cgt ctt agg aag tgt tat gaa	804	
Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu		
115 120 125		
gtg ggc atg atg aaa gga ggt gtt cgc aag gac cgt ggc cgt gtt ttg	852	

39										40									
Val	Gly	Met	Met	Lys	Gly	Gly	Val	Arg	Lys	Asp	Arg	Gly	Arg	Val	Leu				
130					135					140									
cgc	cgt	gat	aaa	cga	cgt	gcl	gga	acc	aal	gac	cga	gag	aag	gcc	ict	900			
Arg	Arg	Asp	Lys	Arg	Arg	Ala	Gly	Thr	Asn	Asp	Arg	Glu	Lys	Ala	Ser				
145					150					155									
aag	gac	ctg	gag	tac	aaa	aca	gtg	ccc	ccf	cag	gac	agg	agg	aaa	cac	948			
Lys	Asp	Leu	Glu	Tyr	Lys	Thr	Val	Pro	Gln	Asp	Arg	Arg	Lys	His					
160					165					170					175				
agc	agc	agc	agc	agt	gcc	ggt	gga	gga	gga	aaa	tca	tca	gtg	acc	996				
Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Ser	Ser	Val	Thr					
180					185					190									
ggg	atg	ict	ccf	gac	cag	gtg	ctc	ctc	ctg	ctc	cag	ggt	gcc	gag	ccc	1044			
Gly	Met	Ser	Pro	Asp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro					
195					200					205									
cca	atg	ctg	tcg	tcg	cgt	cag	aag	ctg	agc	cga	ccg	tac	acc	gag	gtc	1092			
Pro	Met	Leu	Cys	Ser	Arg	Gln	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Tyr	Thr	Glu	Val				
210					215					220									
acc	ala	atg	aca	cta	ctc	acc	agc	atg	gcc	gat	aag	gag	ctg	gtc	cac	1140			
Thr	Ile	Met	Thr	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Ala	Asp	Lys	Glu	Leu	Val	His				
225					230					235									
atg	atc	acc	tgg	gcc	aag	aag	ctt	cca	ggt	ttc	ctg	cag	ctg	ict	ctc	1188			
Met	Ile	Thr	Trp	Ala	Lys	Lys	Leu	Pro	Gly	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Leu				
240					245					250					255				
cat	gac	cag	gtg	cag	ctg	ctg	gag	agc	tcg	tgg	ctg	gag	gtg	ctg	atg	1236			
His	Asp	Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Ser	Trp	Leu	Glu	Val	Leu	Met				
260					265					270									
att	ggg	ctc	ala	tgg	agg	tcg	atc	cac	tgc	ccc	ggc	aaa	ctc	atc	ttc	1284			
Ile	Gly	Leu	Ile	Trp	Arg	Ser	Ile	His	Cys	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Phe				
275					280					285									
gca	cag	gac	ctc	ata	ctg	gac	agg	aal	gaa	ggt	gac	tgt	gtg	gaa	ggc	1332			
Ala	Gln	Asp	Leu	Ile	Leu	Asp	Arg	Asn	Glu	Gly	Asp	Cys	Val	Glu	Gly				
290					295					300									
ttt	gtt	gag	atc	ttc	gac	aig	ctg	cig	gcc	act	gcc	tcg	cgc	ttc	cgc	1380			
Phe	Val	Glu	Ile	Phe	Asp	Met	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Arg	Phe	Arg				
305					310					315									
atg	ctc	aaa	ctc	aaa	ccf	gag	gag	ttt	gtc	tgc	ctc	aaa	gct	atc	atc	1428			
Met	Leu	Lys	Leu	Lys	Pro	Glu	Glu	Phe	Val	Cys	Leu	Lys	Ala	Ile	Ile				
320					325					330					335				
ctg	ctc	aac	ict	ggt	gcc	ttc	ttc	ttc	tgc	acc	ggc	aca	atg	gag	ccc	1476			
Leu	Leu	Asn	Ser	Gly	Ala	Phe	Ser	Phe	Cys	Thr	Gly	Thr	Met	Glu	Pro				
340					345					350									
ctc	cac	aac	agc	atg	gca	gtg	cag	aac	atg	ctg	gac	acc	atc	aca	gac	1524			
Leu	His	Asn	Ser	Met	Ala	Val	Gln	Asn	Met	Leu	Asp	Thr	Ile	Thr	Asp				
355					360					365									
gct	ctc	ata	cat	cat	atc	agc	caa	tca	gga	tgc	tcg	gct	cag	cag	cag	1572			
Ala	Leu	Ile	His	His	Ile	Ser	Gln	Ser	Gly	Cys	Ser	Ala	Gln	Gln	Gln				
370					375					380									
tgc	agg	cgg	cag	gcc	cag	ctg	ctg	ctc	ctc	tcg	cac	atc	agg	cac		1620			
Ser	Arg	Arg	Gln	Ala	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	His	Ile	Arg	His					
385					390					395									

41	42
alg agc aac aaa ggc alg gag cat ctc tac agc alg aag lgc aag aac	1668
Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn	
400 405 410 415	
aaa glg ccl ctt tac gac ctt ctg ctg gag alg ttg gac gct cac cgt	1716
Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg	
420 425 430	
ala cac cgc cca gac aga cca gct cag ttc tgg tcc cag gct gac gga	1764
Ile His Arg Pro Asp Arg Pro Ala Gln Phe Trp Ser Gln Ala Asp Gly	
435 440 445	
gag ccl ccc ttc att aac aac aac agc agc aac agt ggc agc aat	1812
Glu Pro Pro Phe Ile Asn Asn Asn Ser Ser Asn Ser Gly Ser Asn	
450 455 460	
ggc ggc gtc tcc tct tca gtc ggt tcc agt tca gga ccc cga gtc aac	1860
Gly Gly Val Ser Ser Ser Val Gly Ser Ser Ser Gly Pro Arg Val Asn	
465 470 475	
cac gag agc ccg agc aga gga ccc aca ggt cca gga gtc ctg cag tac	1908
His Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Thr Gly Pro Gly Val Leu Gln Tyr	
480 485 490 495	
gga ggg tcc cgc tct gac tgc acc cac atc cta tga ggccgagcac aacaaa	1960
Gly Gly Ser Arg Ser Asp Cys Thr His Ile Leu	
500 505	
catcigaagg tcaaaagtaa tttttacaga tgaigtiggt tglacagaat gaaagctaaa	2020
ggltgtattt taattaatlt calgagataa ttatttataa attaaigtat ttatagtgtg	2080
taactgtttt agggagtttt ttttcttttg cactaalcia gttaactaca acacagagctt	2140
caalgcaggc aatctactat gctgccttcc ataatatctg tgaattctgag tgaagtacgc	2200
taatttttc cagggttag gctatattgt ggccacagc taattgtgatt tgaatgaca	2260
agcagctaat ttgcctttgt attgcctcca accaaatgic acttcttctt gggtttatig	2320
ggcaatgttt ttacttttac atattgggat taggaatgc agacactaaa ctatgataaa	2380
aaacagggtc aaatgaatgt ggaatttatt ttgtttttaa attccaat catlaaagag	2440
ccigaacgic aggtattgtg tctlaagcgt gcacgcaaac ttlaaacctc tggaaaacaa	2500
atatctctat galgaataa taaaattaac agtgatlgag gatgtatgtt gaaticagag	2560
tagatacaat ttgcacaatc aaatcttaga gcactatca callatgaaa gaagcaaac	2620
tttccaaat ttattgttgg ttaacttcc cactccagc ttlttgttaa tggtaggttt	2680
gtctgtagg cttaactgca caagagtttt ttcttgaat ttgagatatt ttaigtgtgt	2740
ctcacaagaa aagactigaa aatctgagga aatttctat aagtgccctt aagctttcta	2800
tcttatgca gticagaatt tcaaatgttt actattatc cactaatca gtatgtacat	2860
gttaggttgg gcttgattta cacaactcca aaagctagt tatcaltaaa taigtgata	2920
tgcaattgtt ttattttgt ttaaatggaa caaatttaat ctaaaactaa tatggacctg	2980
accagggttt ttctttatla gctgtctaac atctgaagc accattgtta atagtgtgt	3040
ttatatagt aaatagcttt ttccatgacc atcaaaagccc tccaaaagaa agctaagt	3100
ttttctaat tcttgatata acagactcca aaatcacat ggaigtgtac tgaacaagtc	3160
ctgtcttaig ttgttttaca tglcaaccag caactgtcgc acactgtgc tgttttgtat	3220
ctctccaaga acagttgttc agtcacaggt ttgtcacaca ggtagaacaa tctgttaata	3280
tactgaaaaa aaggccagag gttagcgtgt agagaatgt gccagaaac aaatgataa	3340
caaagatctg tgcactttaa acaagaatgg aaagcttcta tacagggtca ggaacatgga	3400
tttgacacat tgaagtgc aa gtcaaacctg accgttctat tgtttactgt gcaataaaat	3460
aaaaacalia attgggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3499
<210> 3	
<211> 996	
<212> DNA	

<213> *Lepomis centrarchidae*

<400> 3

aggagcaicc aaggicacaa igactacag igcccagcaa ccaalcagig tactatigac 60
 aggaalcgga gaaagagcig ccaggcctgc cgtcttagga agtigitaga agtgggcatg 120
 algaaggagg gtlctcgcaa ggaccgtggc cgtgttttgc gccgtgataa acgacgtgct 180
 ggaaccaatg accgagagaa ggccctlaag gaccctgagt acaaaacagt gcccccicag 240
 gacaggagga aacacagcag cagcagcagc gccgtgtgtg gaggaggaaa atcatcagig 300
 accgggagtg ctctcgacca ggtgcctctc ctgcctcagg gtgcagagcc cccaatgcig 360
 tgcctccctc agaagctgag ccgaccgtac accgaggcca ccaalagac actacacacc 420
 agcatggccg ataaggagct ggctccatg alcaccctgg ccaagaagct tccaggcttc 480
 ctgcagctgt ctctccatga ccaggctcag ctgcctgaga gctcgtggct ggaggctcig 540
 atgattgggc tcatatggag gtccatccac tgcctccgga aactcatctt cgcacaggac 600
 ctcatatggc acaggaatga aggtgacgtg gtggaaagct ttgttgatg ctctcagatg 660
 ctgtggccca ctgcctcccg ctctccatg ctcaaatca aaccctgaga gtgtgtctgc 720
 ctcaaagctc tcatctgtgt caactctggt gccctctctt tctgcaccgg cacaatggag 780
 cccctccaca acagcatggc agtgcagaac atgcctggaca ccatcacaga cgtctcata 840
 calcatatac gccaatcagg atgcctggct cagcagcagt cgaggcgga gccccaagctg 900
 ctgtctctgc tctccacat caggcacatg agcaacaaag gcatggagca tctctgcagc 960
 atgaagtga agaacaaggt gccctctgac gacctg 996

<210> 4

20

<211> 582

<212> PRT

<213> *Lepomis centrarchidae*

<400> 4

Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Thr Val Asp
 1 5 10 15
 Phe Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Thr Pro Ala Pro Thr
 20 25 30
 Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Val Pro Leu Asp Ala Gln
 35 40 45
 Gly Pro Pro Ser Asp Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr
 50 55 60
 Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met
 65 70 75 80
 His Pro Pro Ser His Tyr Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr
 85 90 95
 Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Gln Gln Pro Val Pro Arg Glu Asp Gln
 100 105 110
 Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ser Tyr Ser Val Gly Glu Ser Gly Ala Gly
 115 120 125
 Ala Arg Gly Phe Glu Met Ala Lys Glu Met Arg Phe Cys Ala Val Cys
 130 135 140
 Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly
 145 150 155 160
 Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met
 165 170 175
 Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Lys Ser
 180 185 190
 Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys

<210> 5

47	48
<211> 1824	
<212> DNA	
<213> <i>Lepomis centrarchidae</i>	
<220>	
<221> CDS	
<222> (74)...(1822)	
<400> 5	
ctcagccttc acagagcctg agacccttc cccacaacgt cccctgcctc cgcctgcctc	60
ccctctcagtg gac atg tac cct gaa gag agc agg ggg tcc gga ggg gla	109
Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val	
1 5 10	
gcc act gtg gac ttt cta gaa ggg acc tac gat tat gcc gcc ccc acc	157
Ala Thr Val Asp Phe Leu Glu Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Thr	
15 20 25	
ccf gcc ccg act cct ctt tac agc cag tct ggc tac tac tct gta cct	205
Pro Ala Pro Thr Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Gly Tyr Tyr Ser Val Pro	
30 35 40	
cig gac gcc caa ggg cca ccc tca gat ggc agc ctt cag tcc cig ggc	253
Leu Asp Ala Gln Gly Pro Pro Ser Asp Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly	
45 50 55 60	
agc ggg cct acc agt cct ctt gta ttt gta cct tcc agc ccc aga ctc	301
Ser Gly Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu	
65 70 75	
agc ccc ttt atg cac ccg ccc agc cac cac tat cta gaa acc acc tca	349
Ser Pro Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser	
80 85 90	
aca ccc gtc tac agc tct agt gtc cca tcc agc cag cag cca gtt ccc	397
Thr Pro Val Tyr Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Gln Gln Pro Val Pro	
95 100 105	
aga gag gac cag tgt gcc acc agt gat gag tcc tat agt gta ggg gag	445
Arg Glu Asp Gln Cys Ala Thr Ser Asp Glu Ser Tyr Ser Val Gly Glu	
110 115 120	
tca ggg gct gga gcc agg ggg ttt gag atg gcc aag gag atg cgt ttc	493
Ser Gly Ala Gly Ala Arg Gly Phe Glu Met Ala Lys Glu Met Arg Phe	
125 130 135 140	
tgt gct gta tgc agt gac tat gcc tct ggg tac cac tac ggg gta tgg	541
Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp	
145 150 155	
tcc tgt gaa ggc tgt aag gcc ttc ttt aag agg agc atc cag ggt cac	589
Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His	
160 165 170	
aat gac tat atg tgc cca gca acc aat cag tgt act att gac agg aat	637
Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn	
175 180 185	
cgg aga aag agc tgc cag gct tgc cgt ctt agg aag tgt tat gaa gta	685
Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val	
190 195 200	
ggc atg atg aaa gga ggt gtt cgc aag gac cgt ggc cgt gtt ttg cgc	733

49		50
Gly Met Met Lys Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Gly Arg Val Leu Arg		
205	210	215
cgt gat aaa cga cgt gct gga acc aat gac cga gag aag gcc tct aag		781
Arg Asp Lys Arg Arg Ala Gly Thr Asn Asp Arg Glu Lys Ala Ser Lys		
225	230	235
gac ctg gag tac aaa aca gtg ccc cct cag gac agg agg aaa cac agc		829
Asp Leu Glu Tyr Lys Thr Val Pro Pro Gln Asp Arg Arg Lys His Ser		
240	245	250
agc agc agc agt gcc ggt ggt gga gga aaa tca tca gtg acc ggg		877
Ser Ser Ser Ser Ala Gly Gly Gly Gly Lys Ser Ser Val Thr Gly		
255	260	265
atg tct cct gac cag gtg ctc ctc ctg ctc cag ggt gcc gag ccc cca		925
Met Ser Pro Asp Gln Val Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro		
270	275	280
atg ctg tgc tcc cgt cag aag ctg agc cga ccg tac acc gag gtc acc		973
Met Leu Cys Ser Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr		
285	290	295
ata alg aca cta ctc acc agc alg gcc gat aag gag ctg gtc cac alg		1021
Ile Met Thr Leu Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met		
305	310	315
atc acc tgg gcc aag aag ctt cca ggt ttc ctg cag ctg tct ctc cat		1069
Ile Thr Trp Ala Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His		
320	325	330
gac cag gtg cag ctg ctg gag agc tgc tgg ctg gag gtg ctg alg att		1117
Asp Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile		
335	340	345
ggg ctc ata tgg agg tcc atc cac tgc ccc ggc aaa ctc atc ttc gca		1165
Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala		
350	355	360
cag gac ctc ata ctg gac agg aat gaa ggt gac tgt gtg gaa ggc tit		1213
Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Phe		
365	370	375
gtt gag atc ttc gac alg ctg ctg gcc act gcc tcc cgc ttc cgc alg		1261
Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Met		
385	390	395
ctc aaa ctc aaa cct gag gag ttt gtc tgc ctc aaa gct atc atc ctg		1309
Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu		
400	405	410
ctc aac tct ggt gcc ttc tct ttc tgc acc ggc aca atg gag ccc ctc		1357
Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu		
415	420	425
cac aac agc atg gca gtg cag aac alg ctg gac acc atc aca gac gct		1405
His Asn Ser Met Ala Val Gln Asn Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala		
430	435	440
ctc ata cat cat atc agc caa tca gga tgc tgc gct cag cag cag tgc		1453
Leu Ile His His Ile Ser Gln Ser Gly Cys Ser Ala Gln Gln Gln Ser		
445	450	455
agg cgg cag gcc cag ctg ctg ctc ctg ctc tcc cac atc agg cac alg		1501
Arg Arg Gln Ala Gln Leu Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met		
465	470	475

51	52
agc aac aaa ggc aig gag cai ctc tac agc atg aag tgc aag aac aaa	1549
Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys	
480 485 490	
gig cct ctt tac gac ctt cig cig gag atg ttg gac gct cac cgt ata	1597
Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Ile	
495 500 505	
cac cgc cca gac aga cca gct cag ttc tgg tcc cag gct gac gga gag	1645
His Arg Pro Asp Arg Pro Ala Gln Phe Trp Ser Gln Ala Asp Gly Glu	
510 515 520	
cct ccc ttc att aac aac aac aac agc agc aac agt ggc agc aat ggc	1693
Pro Pro Phe Ile Asn Asn Asn Asn Ser Ser Asn Ser Gly Ser Asn Gly	
525 530 535 540	
ggc gtc tcc tct tca gtc ggt tcc agt tca gga ccc cga gtc aac cac	1741
Gly Val Ser Ser Ser Val Gly Ser Ser Ser Gly Pro Arg Val Asn His	
545 550 555	
gag agc ccg agc aga gga ccc aca ggt cca gga gtc ctg cag tac gga	1789
Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Thr Gly Pro Gly Val Leu Gln Tyr Gly	
560 565 570	
ggg tcc cgc tct gac tgc acc cac atc cta tga gg	1824
Gly Ser Arg Ser Asp Cys Thr His Ile Leu	
575 580	

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

cccagcgag agcagacagc ctgtggaac 30

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

cttttgacct tcagatgttt gtgtgtctgg 31

<210> 8

40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

aggagacac aaggtcacaa tgactac 27

<210> 9

<211> 28

50

53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 9
 caggctgtac agaggcactt tgttcttg 28
 <210> 10
 <211> 24 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 10
 tctggctact actctgtacc tctg 24
 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA 20
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 11
 cccacacata taggactcal calc 24
 <210> 12
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Lepomis centrarchidae 30

<400> 12
 atgagctctga aagacttggt attaggaaaa gaaaggacgg iggtgaccat ggaggagctg 60
 ag 62
 <210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 40
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 13
 gagcagacag ccttltggaa cagt 24
 <210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR

55

56

<400> 14
 gcccttagac caccaagag cigaagact gggtatag 39
 <210> 15
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 15 10
 gcccttagag ttgtgtcgg cctcatagga tgggggtc 39
 <210> 16
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 16
 ggcaagcttc caccatgtac cctgaagaga gcaggggg 38
 <210> 17
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide for synthesis of promoter DNA
 <400> 17
 gatctcgact ataaagaggg caggctgttc tctaagctc accacgactt ca 52
 <210> 18 30
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide for synthesis of promoter DNA
 <400> 18
 agcttgaagt cgtggtagc cttagaggac agccgcccc cttatagtc ga 52
 <210> 19 40
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 19
 ggccgaattc ggcatgaiga aaggagggtg tcgc 34
 <210> 20
 <211> 33
 <212> DNA 50

57
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 20
 ggccgicgac gicgtcgccc icalaggaigt ggg 33
 <210> 21
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 10

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 21
 gccgaatitg agagagciga cgggcagagc aga 33
 <210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20

<220>
 <223> Designed oligonucleotide primer for PCR
 <400> 22
 gccagatcgt ctcacatgtt ctggcatacc act 33

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、E2 のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区における E2 の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、E2 の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (E2 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、E2 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

【図 2】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、ビスフェノール A のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるビスフェノール A の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、ビスフェノール A の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (ビスフェノール A 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ビスフェノール A 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

【図 3】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、ジエチルstilbestロール (DES) のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区における DES の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、DES の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (DES 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、DES 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1

として示す。

【図 4】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、ゲニステインのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるゲニステインの濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、ゲニステインの DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (ゲニステイン無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ゲニステイン無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

【図 5】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、 o, p' -DDT のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区における o, p' -DDT の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、 o, p' -DDT の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (o, p' -DDT 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、 o, p' -DDT 無添加区のルシフェラーゼ活性値を 1 として示す。

【図 6】本発明遺伝子 bger α を用いたレポーターアッセイにより、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OH-HTM) のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区において 10nM の E2 と共存させた 4-OH-HTM の濃度を付記した。左端の 0 のカラムは、4-OH-HTM の DMSO 溶液に換えて DMSO を終濃度 0.1% となるように添加した区 (4-OH-HTM 無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、4-OH-HTM

無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

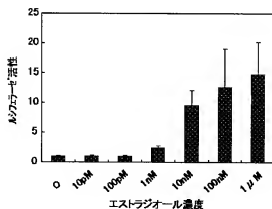
【図7】本発明遺伝子bger $\alpha 2$ を用いたレポーターアッセイにより、E2のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるE2の濃度を付記した。左端の0のカラムは、E2のDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (E2無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、E2無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

【図8】本発明遺伝子bger $\alpha 2$ を用いたレポーターアッセイにより、ビスフェノールAのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるビスフェノールAの濃度を付記した。左端の0のカラムは、ビスフェノールAのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (ビスフェノールA無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ビスフェノールA無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

【図9】本発明遺伝子bger $\alpha 2$ を用いたレポーターアッセイにより、ジェチルスチルベステロール (DES) のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるDESの濃度を付記した。左端の0のカラムは、DESのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (DES無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、DES無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

【図10】本発明遺伝子bger $\alpha 2$ を用いたレポーターア

【図1】



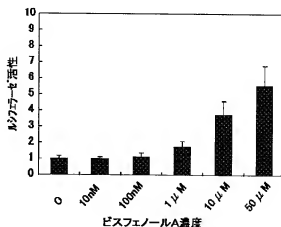
ッセイにより、ゲンisteinのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるゲンisteinの濃度を付記した。左端の0のカラムは、ゲンisteinのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (ゲンistein無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、ゲンistein無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

【図11】本発明遺伝子bger $\alpha 2$ を用いたレポーターアッセイにより、o,p'-DDTのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=6) を示す図である。横軸には、各試験区におけるo,p'-DDTの濃度を付記した。左端の0のカラムは、o,p'-DDTのDMSO溶液に換えてDMSOを終濃度0.1%となるように添加した区 (o,p'-DDT無添加区) を示す。縦軸には、ルシフェラーゼ活性値を、o,p'-DDT無添加区のルシフェラーゼ活性値を1として示す。

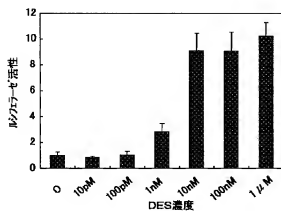
【図12】本発明遺伝子を用いたツーハイブリッドシステムにより、E2、エストロン、エストリオールのエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=4) を示す図である。横軸には、化合物の濃度を付記した。縦軸には、 β ガラクトシダーゼ活性値を、化合物無添加区の β ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

【図13】本発明遺伝子を用いたツーハイブリッドシステムにより、各種化合物のエストロゲンレセプター活性化能を測定した結果 (N=4) を示す図である。横軸には、 β ガラクトシダーゼ活性値を、1nMのE2添加区の β ガラクトシダーゼ活性値を1として示す。

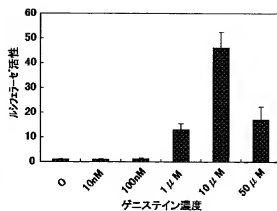
【図2】



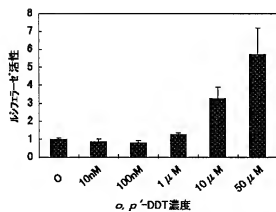
【図3】



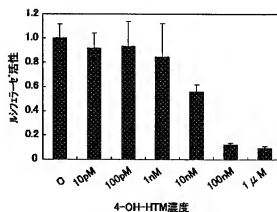
【図4】



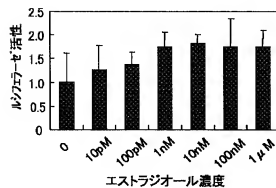
【図5】



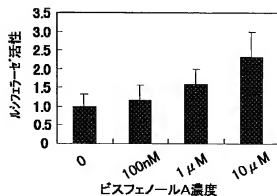
【図6】



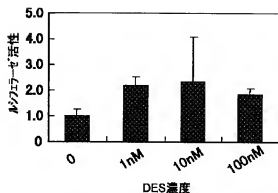
【図7】



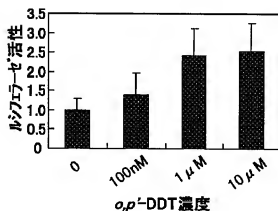
【図8】



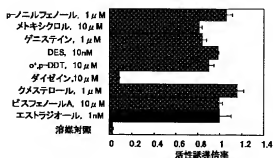
【図 9】



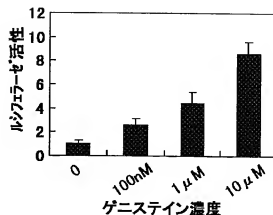
【図 11】



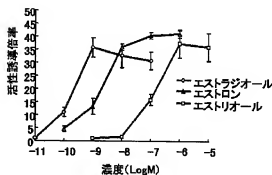
【図 13】



【図 10】



【図 12】



フロントページの続き

(5) Int. Cl. 7

識別記号

F I

テ・マ・ド (参考)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 R 1:645)

// (C 1 2 N 1/19

1:91)

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 P 21/02

C

(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:645)

(34)

C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 Q 1/02
C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 Q 1/02
C 1 2 R 1:91)
C 1 2 N 15/00
5/00
C 1 2 R 1:91)

Z N A A
B